

3/PRTS

420 Rec'd PCT/PTO 0 1 OCT 1999

Unser Zeichen: K 2539 - hu / msl

Protein zur Inhibierung von Apoptose

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein, das sich zur Inhibierung von Apoptose eignet, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

5

Apoptose ist der programmierte Zelltod. Dieser wird z.B. vom Immunsystem dazu genutzt, schädliche Stoffe, wie Viren, abzuwehren. Hierzu greifen Virus-spezifische T-Lymphozyten jene Zellen des Körpers an, die Virus-infiziert sind und töten diese ab, indem sie Apoptose-induzierte Proteine, wie Perforin, freisetzen. Auch können die T-Lymphozyten den CD95 (APO-1/Fas)-Liganden exprimieren, wodurch der Zelltod über den CD95-Weg abläuft. Dieser Weg umfaßt die Bindung des CD95-Liganden an den CD95-Rezeptor, der dann mit dem Adapterprotein FADD interagiert, wodurch das "Recruitment" und die Aktivierung der Protease FLICE am DISC ("Death-Inducing Signaling Complex") induziert werden.

15

Weitere Arbeiten weisen darauf hin, daß Apoptose auch für die Ausbildung verschiedener Erkrankungen mit verantwortlich ist. Solche Erkrankungen sind z.B. AIDS, Autoimmunerkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen. Um gegen diese Erkrankungen vorgehen zu können, wäre es hilfreich, Substanzen zu haben, die Apoptose inhibieren können. Solche Substanzen sind jedoch bisher nur unzureichend bekannt.

25

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem Apoptose inhibiert werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Protein, das sich zur Inhibierung von Apoptose eignet, wobei das Protein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.

10 Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in Tieren, besonders Säugetieren ganz besonders dem Menschen, ein Protein existiert, das Apoptose inhibieren kann. Dieses Protein umfaßt die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß das Protein mit dem Adapterprotein FADD interagiert, wodurch das "Recruitment" und die Aktivierung der Protease FLICE am DISC inhibiert werden.

15 In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit FLIP ("FLICE-Inhibitory-Protein") bezeichnet.

20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für FLIP kodierende Nukleinsäure. Dies kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- 25 (a) die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
(b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
(c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

30 Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit

einer DNA von (a) hybridisiert.

Die DNA von Fig. 1 wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als C-FLIP/2/W23795 bzw. C-FLIP/1/AA115792 unter
5 DSM 11488 bzw. DSM 11487 am 25. März 1997 hinterlegt.

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

10 Eine erfindungsgemäße cDNA kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist es von einer humanen Expressions-Bibliothek auszugehen und diese mit der DNA von Fig. 1, insbesondere mit Primern, die den 5'- bzw. 3'-Bereich der umrandeten DNA-Region betreffen, zu screenen. Als Hybridisierungs-Bedingungen können übliche, insbesondere vorstehend angegebene, gewählt werden.
15 Positive Klone können dann auf ihre Apoptose-Inhibierungsaktivität in üblichen Verfahren getestet werden.

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Ex-
20 pressionsvektors für E.coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDMB, pCEV4 und pEFrsFLAG anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

25 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen
30 L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa und BJAB sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen

Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

5

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragment davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert. Ein erfindungsgemäßer Antikörper, der gegen ein Protein mit der Aminosäuresequenz von Fig. 2 gerichtet ist, wurde als NF6 bei der DSM am 1. April 1998 hinterlegt.

15

20

25

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, Apoptose und ihre Wirkung, insbesondere bei bestimmten Erkrankungen, wie AIDS, Autoimmunerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen, im Detail zu untersuchen. Mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, und hiervon abgeleiteten Primern, kann in Säugetieren, insbesondere dem Menschen, festgestellt werden, ob sie ein Gen enthalten und/oder exprimieren, das für ein FLIP-Protein im vorstehenden Sinne kodiert. Hierzu wird der Fachmann übliche Verfahren, wie

30

Reverse Transkription, PCR-Reaktion, Hybridisierung und Sequenzierung, durchführen. Erfindungsgemäß wird auch ein Kit bereitgestellt, der eine vorstehende Nukleinsäure, insbesondere DNA, und/oder hiervon abgeleitete Primer sowie Träger und übliche Hilfsstoffe enthält.

5

Ferner eignet sich die vorliegende Erfindung, Apoptose zu inhibieren. Dies hat insbesondere bei Erkrankungen, wie AIDS und neurodegenerativen Erkrankungen, eine große Bedeutung. Ein erfindungsgemäßes FLIP-Protein kann in Säugtieren, insbesondere den Menschen, eingebracht werden. Hierzu kann es günstig sein, FLIP an ein vom jeweiligen Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, zu koppeln. Auch kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, in Säugetieren, insbesondere den Menschen, eingebracht und dort exprimiert werden. Hierzu kann es günstig sein, die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure unter die Kontrolle eines Gewebe-spezifischen Promotors zu stellen. Vektoren, die für die Expression einer Nukleinsäure in Säugetieren geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt. Desweiteren kann mit einem erfindungsgemäßen Antikörper die Expression von FLIP kontrolliert und reguliert werden. Der Antikörper kann ferner in vorstehendem Kit vorliegen.

20

Die vorliegende Erfindung stellt somit einen großen Beitrag zur diagnostischen und therapeutischen Erfassung von apoptotischen Prozessen dar. Die diagnostische Erfassung kann dabei nicht nur post- sondern bereits auch pränatal erfolgen.

25

Kurze Beschreibung der Zeichnung:

Fig. 1 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz, die von einem erfindungsgemäßen FLIP-Protein umfaßt ist. Die umrandete Sequenz gibt eine DED (Death Effector Domain)-Region wieder. Die Sequenz von Fig. 1 findet sich in DSM 11488.

30

Fig. 2 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz, die von einem erfindungsgemäßen FLIP-Protein umfaßt ist. Die Sequenz von Fig. 2 findet sich in DSM 11487.

5 Fig. 3 zeigt in (A) die Expression eines erfindungsgemäßen FLIP-Proteins in Zellen. Durch den FLAG-Tag-Anteil zeigt das erfindungsgemäße FLIP-Protein (FLIP-FLAG) ein langsames Laufverhalten als das von den Zellen endogen exprimierte FLIP-Protein. In (B) wird die Inhibierungswirkung des erfindungsgemäßen FLIP-Proteins auf CD95-vermittelte Apoptose und in (C) seine Inhibierungswirkung auf die
10 Aktivierung der Protease FLICE gezeigt.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

15

Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen FLIP-Proteins

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen FLIP-Proteins wird die DNA von Fig. 1 mit Bam HI-Linkern versehen, mit Bam HI nachgeschnitten und in den mit Bam HI gespaltenen Expressionsvektor pQE-8 (Diagen) inseriert. Es wird das Ex-
20 pressionsplasmid pQ/FLIP erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen FLIP-Protein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQ/FLIP wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesmann, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) ver-
25 wendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 10 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der
30 Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

5 Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 2: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

10 Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beipiels 1 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 20-60 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, be-
15 stimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsproteine werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

20 Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0:	1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14:	2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
25 Tag 28:	3. Immunisierung (icFA)
Tag 56:	4. Immunisierung (icFA)
Tag 80:	Ausbluten

30 Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen), J., J.Biochem.Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western

Blot-Analyse wird wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter 1 h bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschr

5 Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschr

10 3-indolylphosphat, 400 µM Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung werden 40 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml kompletten bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA).

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung werden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei

der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
5 Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungs-
10 gemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

**Beispiel 3: Expression eines erfindungsgemäßen FLIP-Proteins in Zellen und
seine Wirkung**

15 (a) Die DNA von Fig. 2 wird mit ExoR5-/XbaI-Linkern versehen, mit EcoRI
und XbaI nachgeschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen
gespaltenen Expressionsvektor pEFrsFLAG inseriert. Es wird das
Expressionsplasmid pEFrsFLAG-FLIP erhalten. Dieses kodiert für ein
Fusionsprotein FLAG-FLIP aus einem FLAG-Tag (N-Terminuspartner) und
20 dem erfindungsgemäßen FLIP-Protein von Fig. 2 (C-Terminuspartner).
pEFrsFLAG-FLIP wird zur Transfektion der humanen Zellen BJAB ver-
wendet. Aus transfizierten Zellen werden Extrakte gewonnen und auf
einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wird
ein Westernblot-Verfahren durchgeführt, in dem ein monoklonaler Antikör-
25 per von Beispiel 2 zum Nachweis des exprimierten FLIP-Proteins verwen-
det wird. Zur Detektion der Antikörperbindung wird ein anti-Maus Antikör-
per verwendet (vgl. Fig. 3A).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes FLIP-Protein in Zellen exprimiert
30 und durch einen erfindungsgemäßen Antikörper nachgewiesen werden
kann.

- (b) Die vorstehenden mit pEFrs FLAG-FLIP transfizierten BJAB-Zellen werden unbehandelt oder mit 10 ng/ml anti-APO-1 behandelt 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch die Behandlung mit anti-APO-1 wird CD95-vermittelte Apoptose induziert. Die Menge der apoptotischen Zellen wird mittels Bestimmung der DNA-Fragmentierung bestimmt (vgl. Fig. 3B).

Es zeigt sich, daß durch die Expression des erfindungsgemäßen FLIP-Proteins CD95-vermittelte Apoptose gehemmt werden kann.

- (c) BJAB-Zellen sowie mit pEFrsFLAG-FLIP transfizierte BJAB-Zellen werden mit 1 µg/ml anti-APO-1 behandelt. Zellextrakte werden gewonnen und in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wird ein Westernblot-Verfahren durchgeführt, in dem ein gegen die Protease FLICE gerichteter Antikörper verwendet wird (vgl. Fig. 3C).

Es zeigt sich, daß in Zellen, in denen das erfindungsgemäße FLIP-Protein exprimiert ist, die Aktivierung von FLICE, d.h. die Spaltung in die aktive Untereinheit p18, verhindert wird.

Patentansprüche

1. Protein, geeignet zur Inhibierung von Apoptose, wobei das Protein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.
- 5 2. Protein nach Anspruch 1, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 2
3. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1, wobei die DNA umfaßt:
 - (a) die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
 - 10 (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
 - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
4. DNA nach Anspruch 3, umfassend die Basensequenz von Fig. 2.
- 15 5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
- 20 7. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeigneten Bedingungen.
8. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
- 25 9. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Inhibierung von Apoptose.
10. Verwendung der DNA nach Anspruch 3 oder 4 als Reagens zur Diagnose und/oder Inhibierung von Apoptose.
- 30

11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Apoptose-Inhibierung bei AIDS oder neurodegenerativen Erkrankungen erfolgt.

Zusammenfassung

Protein zur Inhibierung von Apoptose

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein, das sich zur Inhibierung von Apoptose eignet, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

AGAGTAGGATGTCCTGAAGICATCCATCAGGTGAAGAAGCACCTTGATACAGATGAGAAGGAGATGCT
K S R M S A E V I H Q V E E A L D I D E K E M L 70

GCTCTTTTGTGCCGGGATGTTGCTATAGATGTGGTTCACCTAATGICAGGGACCTTCTGGATAATTTA
L F L C R D V A I D V V P P N V R D L L D I L 140

CGGGAAGAGGTAAGCTGTCGTCGGGGACTTGGCIGAACIGCTCTACAGAGTGAGGCGGATTTGACCTGC
R E R G K L S V G D L A E L L Y R V R R F D L 210

TCAAACGTATCTTGAAGATGGACAGAAAAGCIGIGGAGACCCACCTGCTCAGGAACCCCTCACCCTTGTTC
L K R I L K M D R K A V E T H L L R N P H L V S 280

GGACTATAGAGTGTGATGTCAGAGATTGGTGA
D Y R V L M S E I G E 313

DEED

Fig. 1

Fig. 2

ATGTCIGCIGAGTCATCCATCAGGTTGAAGAAGCACTTGATACAGATGAGAAGGAGATGCTGCTCTTTTTTGTGCGGGGATGTTGCTATAGATGTGGTTCACCTAAATGT 110
 Met Ser Ala Glu Val Ile His Gln Val Glu Glu Ala Leu Asp Thr Asp Glu Lys Glu Met Leu Leu Phe Leu Cys Arg Asp Val Ala Ile Asp Val Val Pro Asn Val

 CAGGGACCTTCTGGATATTTACGGGAAAGAGGTAAGCTGTCTGTGTCGGGGACITGGCTGAACCTGCTCTACAGAGTGAGGCGGATTTGACCTGCTCAAAACGTATCTTGAAGA 220
 Arg Asp Leu Leu Asp Ile Leu Arg Glu Arg Gly Lys Leu Ser Val Gly Asp Leu Ala Glu Leu Leu Tyr Arg Val Arg Arg Phe Asp Leu Leu Lys Arg Ile Leu Lys

 TGGACAGAAAAAGCTGTGGAGACCCACCTGCTCAGGAAACCTTCACCTTGTTCGGACTATAGAGTGTGATGGCAGAGATTGGTGAGGATTTGGATAAAATCTGATGTGTCC 330
 Met Asp Arg Lys Ala Val Glu Thr His Leu Leu Arg Asn Pro His Leu Val Ser Asp Tyr Arg Val Leu Met Ala Glu Ile Gly Glu Asp Leu Asp Lys Ser Asp Val Ser

 TCATTAATTTTCTCATGAAGGATTACATGGGCCGAGCAAGATAAGCAAGGAGAGAGTTTCTTGGACCTTGTGGTTGAGTTGGAGAACTAAATCTGGTGGCCCCAGA 440
 Ser Leu Ile Phe Leu Met Lys Asp Tyr Met Gly Arg Gly Lys Ile Ser Lys Glu Lys Ser Phe Leu Asp Leu Val Val Glu Leu Glu Lys Leu Asn Leu Val Ala Pro Asp

 TCAACTGGATTATTAGAAAAATGCCIAAAGAACAATCCACAGAAATAGACCCTGAAGACAAAAATCCAGAAGTACAAGCAGTCTGTTC AAGGAGCAGGACAAAGTTACAGGA 550
 Gln Leu Asp Leu Leu Glu Lys Cys Leu Lys Asn Ile His Arg Ile Asp Leu Lys Thr Lys Ile Gln Lys Tyr Lys Gln Ser Val Gln Gly Ala Gly Thr Ser Tyr Arg

 ATGTTCTCCAAAGCAGCAATCCAAAAGAGTCTCAAGGATCCTTCAAAIAACTTCAGGCTCCATAATGGGAGAAAGTAAAGAACAAAGACTTAAGGAACAGCTTGGCGCTCAA 660
 Asn Val Leu Gln Ala Ala Ile Gln Lys Ser Leu Lys Asp Pro Ser Asn Phe Arg Leu His Asn Gly Arg Ser Lys Glu Gln Arg Leu Lys Glu Gln Leu Gly Ala Gln

 CAAGAACCAGTGAAGAAATCCATTACAGGAATCAGAAGCTTTTTCGCTCAGAGCATACCTTGAAGAGAGATACAAAGATGAAGAGCAAGCCCTAGGAATCTGCCTGATAAT 770
 Gln Glu Pro Val Lys Lys Ser Ile Gln Glu Ser Glu Ala Phe Leu Pro Gln Ser Ile Pro Glu Glu Arg Tyr Lys Met Lys Ser Lys Pro Leu Gly Ile Cys Leu Ile Ile

 CGATTGCAATTGGCAATGAGACAGAGCTTCTTCGAGACACCTTCACCTTCCCTGGGCTATGAAGTCCAGAAAATTTCTTGCACTTCAGTAIGCATGGTATATCCAGATTCTTG 880
 Asp Cys Ile Gly Asn Glu Thr Glu Leu Leu Arg Asp Thr Phe Thr Ser Leu Gly Tyr Glu Val Gln Lys Phe Leu His Leu Ser Met His Gly Ile Ser Gln Ile Leu

 GCCAATTTGCTGTATGCCCCGAGCACCAGACTACGACAGCTTTGTGTGTCTGTGGTGAGCGAGGCTCCACAGAGTGTGTATGGTGTGGATCAGACTCAGCTCAGGG 990
 Gly Gln Phe Ala Cys Met Pro Glu His Arg Asp Tyr Asp Ser Phe Val Cys Val Leu Val Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ser Val Tyr Gly Val Asp Gln Thr His Ser Gly

 CTCCCCCTGCATCAGGAGGATGTTTCATGGGAGATTTCATGCCCTTATCTAGCAGGGAAGCCAAAGATGTTTTTATTCAGAACTATGTGGTGTGAGAGGGCCAGCT 1100
 Leu Pro Leu His His Ile Arg Arg Met Phe Met Gly Asp Ser Cys Pro Tyr Leu Ala Gly Lys Pro Lys Met Phe Phe Ile Gln Asn Tyr Val Val Ser Glu Gly Gln Leu

 GGAGGACAGCAGCCCTCTTGGAGGTGGATGGGCCAGCGATGAAGAAATGTGGAATTC AAGGCTCAGAAGCGAGGGCTGTGCACAGTTCCACCGAAGAGCTGACTTCTTCIGGA 1210
 Glu Asp Ser Ser Leu Leu Glu Val Asp Gly Pro Ala Met Lys Asn Val Glu Phe Lys Ala Gln Lys Arg Gly Leu Cys Thr Val His Arg Glu Ala Asp Phe Phe Trp

 GCCTGTGTACTGCGGACATGTCCTGCTGGAGCAGTCTCAGAGCTCACCATCCCTGTACCTGCAGTGCCTCTCCAGAAACTGAGACAAGAAAGAAAACGCCCACTCTG 1320
 Ser Leu Cys Thr Ala Asp Met Ser Leu Leu Glu Gln Ser His Ser Ser Pro Ser Leu Tyr Leu Gln Cys Leu Ser Gln Lys Leu Arg Gln Glu Arg Lys Arg Pro Leu Leu

 GATCTTCACATTGAACCTCAATGGCTACATGATGATGGAAACAGCAGAGTTTCTGCCAAGGAGAAATATTATGCTGGCTGCAGCACACTCTGAGAAAGAAACTTATCCT 1430
 Asp Leu His Ile Glu Leu Asn Gly Tyr Met Tyr Asp Trp Asn Ser Arg Val Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Tyr Val Trp Leu Gln His Thr Leu Arg Lys Leu Ile Leu

 CTCCTACACATAA 1443
 Ser Tyr Thr

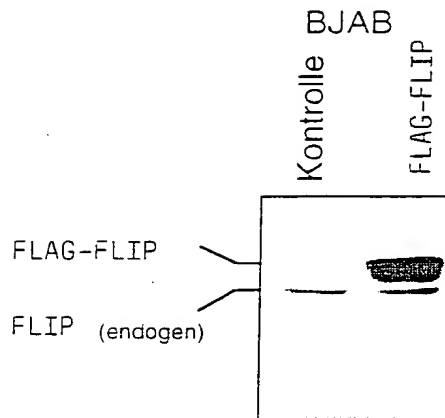
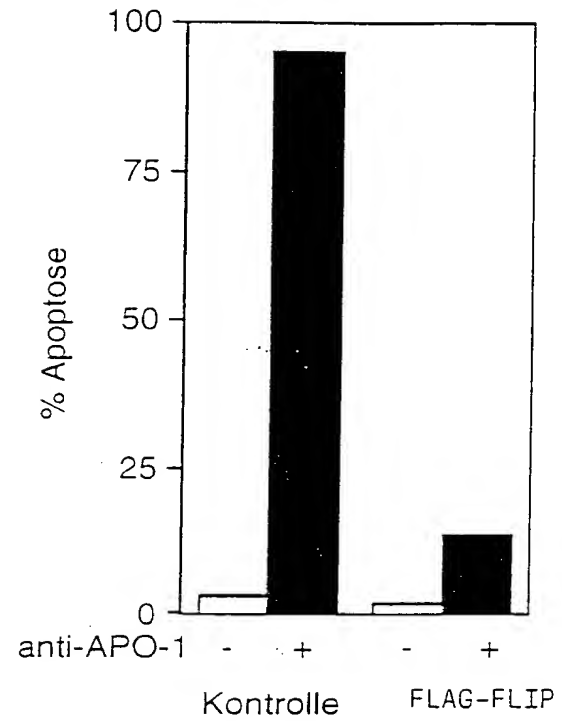
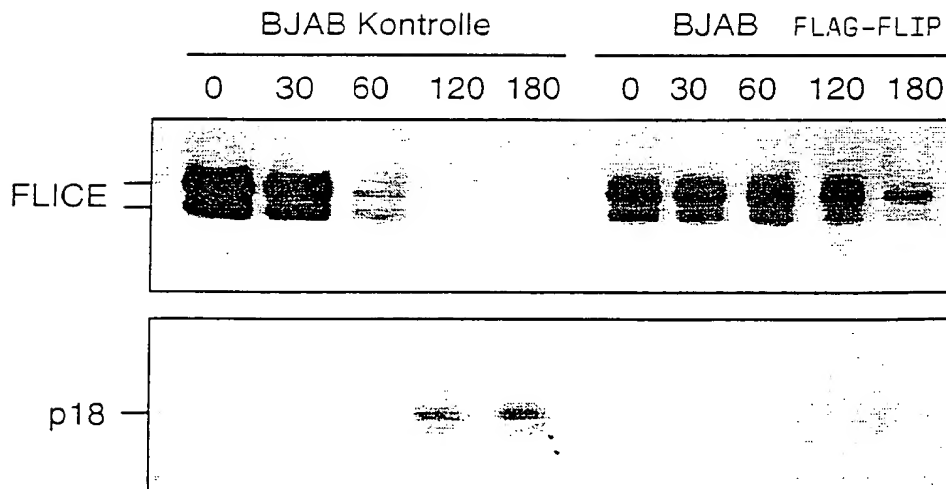
A**B****C**

Fig. 3